

水晶発振子を用いた薬物の in vitro皮膚透過性の迅速定量

＝医薬品の迅速開発のために＝

城西大学 北村 敏彦・長谷川哲也・渡邊 哲也・杉林 堅次

1. はじめに

非破壊・高速・簡易サンプリングによるコストの削減や、分析時間の削減を可能にする薬物の迅速定量法として、フォトダイオードアレイタイプの検出器を有する紫外及び近赤外分光分析、生体分子相互反応解析（BIA）法であるBIAcoreシステム、さらには水晶発振子の利用などが考えられる。たとえば、薬物溶液に近赤外線光（700～2500nm）をあてると、基準分子振動の倍音または結合音の振動が生じ、結果として吸収ピークが出現し、この吸収ピークのスペクトルの違いにより薬物の定量分析ができる。また、BIAcoreシステムでは、表面プラズモン共鳴（SPR）による光学現象により屈折率が変化し、これにより薬物の定量が可能となる。しかし、これらが定量感度などや簡便性の点で問題点を残しているのに対し、水晶発振子はエレクトロニクスの分野で既にマイクロバランスとして応用されている。脂質膜で被覆した水晶発振子では、脂質膜に物質が吸着すると吸着量に応じて振動数が低下し、かつ振動数変化が吸着物質質量に比例するため¹⁾、振動数変化から物質の定量が可能となる。この原理を利用して、水晶発振子が匂いや苦味物質の測定センサーとして実用化されている。なお、本方法によりナノグラムレベルの薬物定量が可能である。さらに、水晶発振子はDNAセンサーとしても使用されている²⁾。発振子電極上に1本鎖DNAを固定化すると、相補的なDNAとの2本鎖形成を質量変化として検出できる。振動数の経時変化から結合や脱着の速度定数を求めることも可能である。

一方、医薬品の開発の分野では、Combinatorial Chemistryの手法とHigh Throughput Screening（HTS）

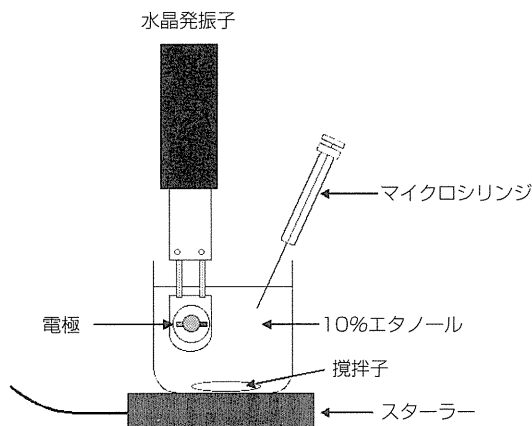
の考え方の普及により、薬物の新規合成速度や薬理活性評価速度が従来より著しく高速化してきた³⁾。しかし、それらの評価速度に比べて薬物の吸収や代謝に関する評価速度、さらにはそれに続く製剤化速度が遅く、残念ながら、これらが新薬開発の律速段階となっている。薬物の生体膜透過性または吸収性を評価する際には、薬物の適用方法に応じて、吸収に寄与する各々の生体膜（消化管、鼻粘膜、膈、肺、皮膚など）に対するHTSシステムが必要である。現在までに、Caco-2などの培養消化管細胞を用いたHTSシステムの開発が試行されているが、その他の組織の培養細胞を用いた検討は少ない。また、これらでは一定時間経過後の薬物取り込み量から吸収速度を見積もることが多いが、実際に透過・吸収量を経時的にモニターできるHTSシステムはほとんどない。特に消化管などと異なり、本来は外来物質に対するバリアーとして機能する皮膚は薬物の透過速度が一般的に遅く、薬物の皮膚透過性を迅速に評価する方法を確立することが急務とされている。

本稿では、医薬品開発に応用されることを念頭におきながら、薬物の皮膚透過性を迅速に評価する方法、特に水晶発振子を用いた方法について説明する¹⁾。

2. インドメタシンの水晶発振子への吸着

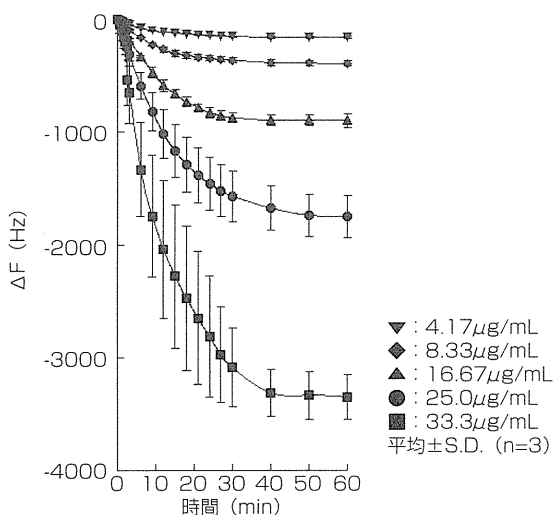
第1図に示したように、ビーカーに10%エタノールを入れ、そこに水晶発振子（9MHz）をセットする。なお、水晶発振子の電極には、塩化ジメチルジステアリルアンモニウムとポリスチレンスルホン酸の1:1ポリイオンコンプレックスを被覆する。ここで、正確な脂質被覆量は、被覆前後の水晶発振子の振動数差から計算して求められる。われわれは、水

晶発振子の振動数変化が安定した後、インドメタシン（バルク中のインドメタシン濃度は4.17、8.33、16.7、25.0、33.3 $\mu\text{g/mL}$ となる）を加え、経時的に振動数変化（ ΔF , Hz）を記録した。なお、このときビーカー内は37 $^{\circ}\text{C}$ に保ち、マグネティックスターラーにより十分攪拌した。



第1図 水晶発振子によるインドメタシン吸着実験セットアップ図

第2図にインドメタシンの吸着による水晶発振子の振動数の減少曲線を示す。減少曲線はインドメタシン適用直後に大きく変動したが、すべての適用濃度において添加後約40minで一定値を示した。すなわち、約40minでバルク溶媒である10%エタノール



第2図 種々濃度のインドメタシン/10%エタノール中における水晶発振子振動数変化

と水晶発振子に被覆した脂質（塩化ジメチルジステアリルアンモニウム）の間でインドメタシンの分配が平衡になったと考えられた。

Okahataは、匂い物質の吸着量は水晶発振子に付着させた脂質の膜厚の増加と共に増大したが、苦味物質の吸着量は膜厚には依存しなかったと報告している³。これは匂い物質は膜の内部まで分配するが、苦味物質は表面のみに分配したためであると考察している。インドメタシンでは、その濃度と水晶発振子の振動数減少との相関性が脂質量で補正することで良くなったことから、この薬物は電極表面にコーティングした脂質の表面だけでなく深部にまで分布することが示唆された。通常、皮膚適用する薬物は脂溶性物質が多く、水晶発振子マイクロバランスはこのような脂溶性薬物の定量に応用しやすいものと思われた。

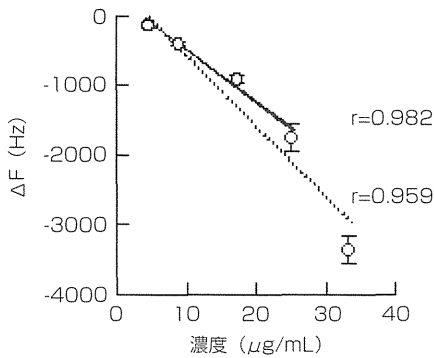
なお、第2図中のデータにおいて、振動数変化 ΔF と時間 t にはほぼ次式の関係がみられている。

$$\Delta F = A(1 - e^{-kt}) \quad \dots(1)$$

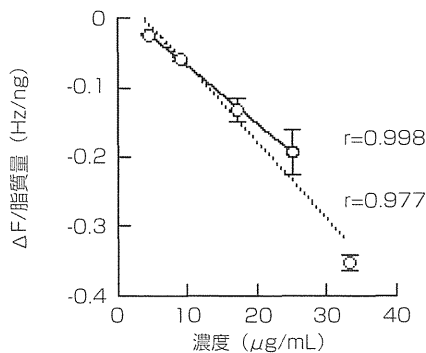
ここで、 A は定常状態時の振動数変化、 k は一次速度定数である。 k はすべてのインドメタシン濃度において約 0.080min^{-1} であった。

さらに、60min後の ΔF を定常状態時の値、 A として、これと10%エタノール中のインドメタシン濃度との関係を調べた。その結果を第3図(a)に示す。また、第3図(a)に示した各点は水晶発振子に付着させた脂質（塩化ジメチルジステアリルアンモニウム）量がわずかに異なっていたので、膜脂質量で補正した振動数変化についても調べた。結果を第3図(b)に示す。インドメタシン濃度（4.2～33.3 $\mu\text{g/mL}$ ）と振動数変化の相関係数は第3図(a)、(b)に示したデータでそれぞれ0.959、0.977であった。またインドメタシン濃度が高いとき相関性が悪くなる傾向にあったので、4.2～25 $\mu\text{g/mL}$ 間で相関係数を求めると、第3図(a)、(b)でそれぞれ0.982、0.998であった。なお、高濃度（33.3 $\mu\text{g/mL}$ ）では直線性からずれたが、この原因についてはまだはっきりしていない。

以上より、膜脂質量で補正した振動数変化量とインドメタシン濃度（4.2～25 $\mu\text{g/mL}$ ）が比例することがわかった。そこで、以後はこの範囲内で検量線が成り立つものとしてインドメタシン濃度を求めることとした。



(a) 脂質量による補正前



(b) 脂質量による補正前

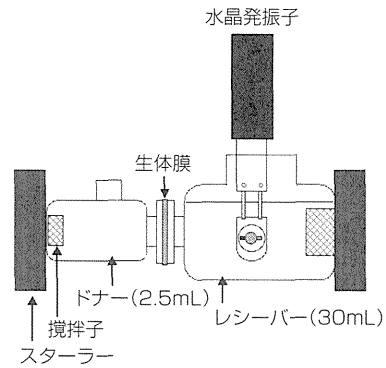
— 4.2~25.0μg/mL
 4.2~33.3μg/mL
 平均±S.D. (n=3)

第3図 10%エタノール中インドメタシン濃度と水晶発振子振動数変化の関係

3. インドメタシンの皮膚透過性

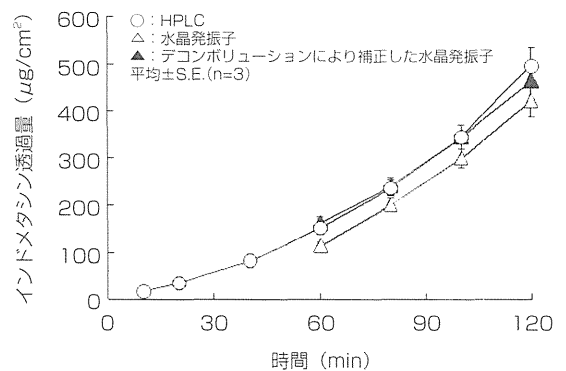
前述したように、水晶発振子マイクロバランスは空気中や溶液中の匂い物質や苦味物質の定量に使用されている。水晶発振器を用いる利点は、測定時間が短く（数分）、サンプルの前処理の必要がないことである。そこで、次にインドメタシンのLiving Dermal Model (LDM)⁶ 透過性を拡散セルを用いて調べることにした。皮膚モデルとして用いたLDMを2-チャンバー横型拡散セルに挟み、膜表面側にインドメタシン溶液を（5mg/mL）を、同裏側に10%エタノールを適用した。水晶発振子はレシーバー溶液である10%エタノール中にセットした。その模式図を第4図に示す。インドメタシンの皮膚透過量は水晶発振子の振動数変化から算出した。

第5図にインドメタシンのLDM累積透過—時間曲線を示す。水晶発振子で評価した薬物の膜透過量



第4図 水晶発振子によるインドメタシン in Vitro 皮膚透過実験セッアップ図

（図△）をHPLCによる測定値（○）と比較したところ、累積透過量は異なるものの定常状態透過速度はほぼ等しかった。なお、水晶発振子の60分以内のデータでは、検量線域より低いインドメタシン濃度であった。



第5図 インドメタシンの累積Living Dermal Model透過量変化

水晶発振子で求めた累積透過量が低い原因は、第2図に示したように、水晶発振子の振動数減少量が一定になるのにlag timeが存在するためと思われた。そこで、水晶発振子で測定した累積皮膚透過量データ（ $Q'(t)$ ）と式(1)を用いて、デコンボリューション⁷により真の累積皮膚透過量 $Q(t)$ を求めた。なお、 $Q'(t)$ と $Q(t)$ の関係は次式で示される。

$$Q'(t) = \int_0^t Q(\theta) (1 - e^{-k(t-\theta)}) d\theta \quad \dots(2)$$

補正した結果 $Q(t)$ を第5図（▲）に示す。図から明らかなように、 $Q(t)$ はHPLCで測定した値とほぼ等しくなった。

第2図に示したように、インドメタシン溶液に水晶発振子を浸したとき、一定の振動数減少が得られるまで数十分必要とした。動物やヒト皮膚は薬物の拡散抵抗が高いため、一般に数時間から数十時間の透過実験時間を要す。このような場合では、一定の振動数減少が得られるまでのlag timeはほぼ無視できる。しかし、迅速評価のために培養皮膚等を用いた場合では膜透過性が速いために、数十分のlag timeでも問題になる。

今回、この欠点を解消するためデコンボリューションという数学手法を用いた。しかし、デコンボリューションを行う際に用いる水晶発振子の振動数減少-時間曲線に関しては式(1)によって簡略に表現できたため、極めて簡単に式(2)を解くことができた。なお、第2図のデータをていねいに観察すると、最初の1分以内に振動数減少がほとんど見られないことがわかる。しかし、この時間が膜透過時間に比べて極めて短いため、今回の計算式ではこの部分を無視している。

4. おわりに

今回使用した水晶発振子では低濃度（約4 μ g/mL以下）のインドメタシンを検出することができなかったため、ドナー側にインドメタシンのエタノール溶液を用いて膜透過速度を促進させた（レシーバーに10%エタノールを用いたのはシンク条件を確保するためである）。この低感度に関する問題は、今後高品質の水晶発振子（27MHz）を用いることで解決できると思われる。また、種々の薬物への応用についても今後電極に吸着させる脂質の種類と量（厚み）を検討することによって成し遂げるものと考えている。

以上、まだ改善する余地は残されているものの、水晶発振子は、Caco-2[®]、Calu-3[®]、さらには Living Skin Equivalent（LSE）等の培養組織膜の利用と並んで、生体膜透過性評価の有用な方法となることが期待できるものと推察された。

<参考文献>

- (1) G.Sauerbrey, Z.Physik: 155, 206-222 (1959).
- (2) Y.Okahata, K.Niikura, H.Furusawa, H.Matsuno, A highly sensitive 27MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on DNA strands, Anal. Sci., 16, 1113-1119 (2000).
- (3) M.H.Tarbit, J.Berman, High-throughput approaches for evaluating

absorption, distribution, metabolism and excretion properties of lead compounds, Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 411-6 (1998).

- (4) 岡畑恵雄：“二分子膜被覆水晶発振子を用いた匂い物質や苦味物質のセンシング”、生物物理、28、1-4 (1988).
- (5) Y.Okahata, Lipid bilayer-corked capsule membranes. Reversible, signal-receptive permeation control, Acc. Chem. Res., 19, 57-63 (1986).
- (6) T.Watanabe, T.Hasegawa, H.Takahashi, T.Ishibashi, K.Takayama, K.Sugibayashi, Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, Altern. Animal Test. Exp., 7, 1-14 (2001).
- (7) J.G.Wagner, E.Nelson, Kinetic analysis of blood levels and urinary excretion in the absorptive phase after single doses of drug, J. Pharm. Sci., 53, 1392-1398 (1964).
- (8) P.Vaishali, S.Salomon, Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells, J. Pharm. Sci., 87, 1604-1607 (1998).
- (9) K.A.Foster, M.L.Avery, M.Yazdanian, K.Audus, Characterization of Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery, Int. J. Pharmaceut., 208, 1-11 (2000).

【筆者紹介】

北村 敏彦

城西大学 薬学部 臨床薬物動態学教室
〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1
TEL：049-271-7367 FAX：049-271-7367

長谷川 哲也

城西大学 薬学部 臨床薬物動態学教室 助手
〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1
TEL：049-271-7367 FAX：049-271-7367

杉林 堅次（滋賀県出身）

城西大学 薬学部 臨床薬物動態学教室 教授
〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1
TEL：049-271-7943 FAX：049-271-7367
E-mail：sugib@josai.ac.jp

渡邊 哲也

帝國製薬(株) 経皮吸収基礎研究部
〒769-2695 香川県大川郡大内町三本松567
TEL：0879-25-2550